



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	The roles of tricellular tight junction protein lipolysis-stimulated lipoprotein receptor in malignancy of human endometrial cancer cells (ヒト子宮内膜癌の悪性化における 3 細胞間タイト結合タンパク lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)の役割)
Author(s) 著 者	嶋田, 浩志
Degree number 学位記番号	甲第 2874 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2016-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 2874 号	氏 名	嶋 田 浩 志
<p>論文題名</p> <p>The roles of tricellular tight junction protein lipolysis-stimulated lipoprotein receptor in malignancy of human endometrial cancer cells ヒト子宮内膜癌の悪性化における 3 細胞間タイト結合タンパク lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) の役割</p> <p>研究目的</p> <p>子宮体癌は、本邦も含めた先進諸国で近年増加傾向にあり、今後の新たな治療戦略が重要となっている。</p> <p>癌細胞において、細胞間接着分子であるタイト結合分子が正常細胞と異なる発現形態をとっていることが報告されている。近年、3 細胞間接着分子である tricellulin (TRIC) が同定され、一部の癌細胞で正常とは異なる発現形態をとっていることが報告され、新たに同定された lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) が 3 細胞間接着の制御に重要であることが分かっている。さらに一部の癌細胞では LSR のノックダウンにより遊走・浸潤が増強したことが報告されているが、子宮体癌における LSR の役割は不明である。</p> <p>一方、肥満は子宮体癌の危険因子であり、adipokine、つまり leptin と adiponectin が肥満における癌の病態生理にとって重要な役割を持っていることが報告されている。さらには、糖尿病治療薬である metformin や berberine に抗腫瘍効果があることも報告されている。LSR は元来、lipoprotein の受容体の候補として同定されているが、子宮体癌における adipokine および metformin、berberine による LSR への影響は分かっていない。</p> <p>そこで今回我々は、子宮体癌および正常子宮内膜細胞および組織を用いて LSR の発現やその役割を解析した。さらに、肥満による子宮体癌の悪性化に着目し、adipokine および metformin、berberine による LSR の機能と発現への影響を解析した。</p> <p>研究方法</p> <p>当科手術検体を用いて、正常子宮内膜組織、子宮内膜癌組織に免疫染色を行い、LSR、TRIC の発現を調べた。また、子宮体癌細胞株 Sawano, HHUA, JHMUE-1, JHMUE-2 において LSR の発現を比較した。次に、Sawano 細胞に対して SiRNA により LSR の発現を低下させ、細胞の遊走・浸潤・増殖能を解析した。</p> <p>Sawano 細胞に対して leptin, adiponectin, metformin, berberine を処置し LSR の発現変化を解析した。また PI3k, MAPK, JAK/STAT3 阻害剤を加えて同様の処置を行い、LSR の発現変化を解析した。</p>			

LSR をノックダウンさせた Sawano 細胞に対して, metformin, berberine 処置によるタンパク発現の変化, 細胞遊走・浸潤・増殖能を解析した. leptin 処置した Sawano 細胞に対しても metformin, berberine 処置による同様の解析を行った.

正常子宮内膜 (HEE) 細胞を分離・培養し, LSR の発現を解析した. さらに leptin, adiponectin, metformin, berberine を処置し, LSR の発現変化を解析した.

タイト結合蛋白の発現変化は, 免疫染色, RT-PCR, Western blot で解析し, 遊走能は Scratch による wound-healing assay, 浸潤能は matrigel による invasion assay, 増殖能は cell count kit 8 により解析した.

研究結果

- 1) 正常子宮組織では月経周期により LSR の局在の変化を認めた. TRIC には変化を認めなかった.
- 2) 子宮内膜症組織および Grade 1 の類内膜癌組織の LSR 局在は正常組織における分泌期の LSR の局在変化と同様であった. Grade 2 および 3 の類内膜腺癌組織では Grade 1 の組織と比べて LSR の発現が低下していた. TRIC の発現は Grade1 から低下を認めていた.
- 3) 子宮内膜癌細胞株で LSR の発現を比較検討した結果, Sawano 細胞に LSR が最も多く発現していた. Sawano 細胞では LSR と TRIC は 3 細胞間接合部に共局在していることも認めた. また Sawano 細胞には leptin 受容体 (OB) および adiponectin 受容体 (R1, R2) も認めた.
- 4) Sawano 細胞で LSR をノックダウンすると, 細胞遊走・浸潤・増殖能が有意に亢進した.
- 5) Sawano 細胞に leptin をしよちすると濃度依存性に LSR の発現が低下し, 逆に adiponectin, metformin, berberine では濃度依存性にその発現が増強していた. LSR の発現の変化に PI3K, MAPK, JAK/STAT3 の関与も認めた.
- 6) LSR をノックダウンした Sawano 細胞の遊走・浸潤・増殖能を metformin, berberine が有意に抑制した.
- 7) leptin 処置を行った Sawano 細胞では, 遊走・浸潤能ともに亢進したが, metformin, berberine がそれらを有意に抑制した.
- 8) ヒト正常子宮内膜 (HEE) 細胞を良性のヒト摘出子宮より分離培養を行った. 正常子宮内膜細胞には LSR, TRIC および OB, R1, R2 の発現も認めた. Sawano 細胞と同様に, leptin により LSR の発現が低下し, adiponectin, metformin, berberine により LSR の発現が増強していた.

考察

本研究で, 子宮内膜癌では悪性度とともに LSR の発現が低下していた. 腺癌で TRIC

の発現と予後の負の相関を認めるとの報告があり、LSR 発現の低下は子宮内膜癌の予後と関連していることが示唆された。また、Sawano 細胞で、Si RNA および leptin 処置による LSR の発現低下は、細胞の遊走・浸潤能を亢進させていた。膀胱癌でも LSR のノックダウンにより細胞の遊走能・浸潤能が亢進したとの報告があり、我々も膀胱癌細胞で同様の結果を得ているが、膜貫通タンパクである LSR の喪失がどのように細胞の遊走・浸潤・増殖能を亢進させるかは不明のままである。

leptin は JAK/STAT3 シグナル伝達を介して細胞の遊走、浸潤を亢進させ、adiponectin は leptin によるそのシグナル伝達を抑制するとの報告がある。以前の我々の研究も含めた報告では、タイト結合の制御には様々なサイトカインや成長因子による独立したシグナル伝達の関与が示唆されている。本研究では、Sawano 細胞および HEE 細胞で、LSR の発現は leptin により低下し、adiponectin により低下していたが、その発現の制御は JAK/STAT3 を介していることが考えられた。

2 型糖尿病治療薬である metformin と berberine は Sawano 細胞および HEE 細胞で LSR の発現を増加させ、さらに、Sawano 細胞において、ノックダウンおよび leptin により LSR の発現低下により亢進した細胞遊走・浸潤能を抑制していた。metformin および berberine は様々なメカニズムにより抗腫瘍効果を発揮すると考えられており、それらによる LSR 発現変化は肥満による子宮内膜癌の悪性化の予防に重要であることが示唆された。

結論

LSR は子宮内膜癌の進展に負の相関を示すことが示唆され、その発現は adipokine である leptin, adiponectin により制御されることが考えられた。LSR は *Clostridium difficile* transferase(CDT)の感染部位であることが知られており、その治療への応用研究が乳癌細胞で始まっている。LSR は子宮内膜癌において、新しい治療ターゲットとなりうるかもしれない。

論文審査の要旨及び担当者

(平成 28 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2874 号	氏 名	嶋田 浩志
論文審査 担 当 者	主査 教授 齋藤 豪	副査 教授 小島 隆	
	委員 教授 澤田 典均	委員 教授 加藤 淳一	

学位論文 の題名	<p>The roles of the tricellular tight junction protein lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) in malignancy of human endometrial cancer cells</p> <p>(ヒト子宮内膜癌の悪性化における 3 細胞間タイト結合タンパク lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)の役割)</p>
<p>結果の要旨</p> <p>本研究は、子宮内膜癌細胞株とヒト正常子宮内膜上皮細胞を用いて、3 細胞間タイト結合タンパク LSR の喪失が癌の悪性化に深く関与し、LSR の発現の変化は肥満との関連があることを示すことを報告したものである。LSR の喪失は子宮内膜癌細胞株の増殖・遊走・浸潤能を亢進させていた。さらに、その作用機序は Hippo 経路を介して、YAP の核内移行を促進させ核内転写因子 TEAD と結合し、癌の増殖・遊走・浸潤に深く関与している EGF like family の AREG の転写を促進していることが示された。また肥満細胞が分泌する adipokine である leptin, adiponectin により LSR の発現の変化がみられている。さらに、metformin, berberine は leptin により亢進した癌細胞株の遊走・浸潤能を抑制していた。正常子宮内膜でも、子宮内膜癌細胞株と同様に、leptin で LSR の発現が低下、metformin, berberine で LSR の発現が増強されていたことから、それらは子宮内膜癌の発癌の予防となりうる可能性があることが示された。</p>	